

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5554247号  
(P5554247)

(45) 発行日 平成26年7月23日(2014.7.23)

(24) 登録日 平成26年6月6日(2014.6.6)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/577	(2006.01)	GO 1 N 33/577	B
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 D

請求項の数 8 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2010-541240 (P2010-541240)	(73) 特許権者	390037327
(86) (22) 出願日	平成21年12月3日(2009.12.3)		積水メディカル株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2009/006590		東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(87) 国際公開番号	W02010/064435	(74) 代理人	110000084
(87) 国際公開日	平成22年6月10日(2010.6.10)		特許業務法人アルガ特許事務所
審査請求日	平成24年11月20日(2012.11.20)	(74) 代理人	100068700
(31) 優先権主張番号	特願2008-309369 (P2008-309369)		弁理士 有賀 三幸
(32) 優先日	平成20年12月4日(2008.12.4)	(74) 代理人	100077562
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹
		(74) 代理人	100111028
			弁理士 山本 博人

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト体液中のシスタチンC測定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、同一の粒子径を有する不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を用いた粒子増強免疫測定方法であって、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が、1重量%以上5重量%未満であり、

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数(kd値)が1nM未満で、該解離定数で相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数を除した比が2以上であるヒト体液中のシスタチンC測定方法。

10

【請求項2】

不溶性担体粒子の平均粒子径が0.1~0.4μmである請求項1記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項3】

抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体が機能部位を含む抗体断片あるいは組換え型抗体である請求項1又は2記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項4】

ヒト体液が血清、血漿、滑液、乳、唾液、脳脊髄液、精漿、羊水、尿又は涙液である請求項1~3のいずれかが1項記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項5】

20

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体が1種であり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体が1種である請求項1～4のいずれか1項記載のヒト体液中のシスタチンC測定方法。

【請求項6】

高親和性のヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、同一の粒子径を有する不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子であって、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が1重量%以上5重量%未満であり、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数(k<sub>d</sub>値)が1nM未満で、該解離定数で相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数を除した比が2以上である抗体感作粒子を含有する、ヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定試薬。

10

【請求項7】

不溶性担体粒子の平均粒子径が0.1～0.4μmである請求項6記載の測定試薬。

【請求項8】

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体が1種であり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体が1種である請求項6または7記載の測定試薬

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、ヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法及び粒子増強免疫測定試薬に関する。

【背景技術】

【0002】

シスタチンCは、分子量13kDaの塩基性低分子タンパク質(等電点pH9.3)で、全身の有核細胞で絶えず産生され、環境変化の影響を受けずに一定量が細胞外に分泌される。このため、血中濃度が一定となり他の疾患による炎症などの影響や年齢、性別、運動、食事などの影響を受けない。また、シスタチンCは、他の血漿タンパク質と複合体を形成せず、腎系球体で濾過されて近位尿細管で再吸収されるため、糸球体濾過率(GFR)が低下すると、血中濃度が上昇することが知られており、クレアチニンに代わるGFRを表す指標として注目されている。また、腎機能検査において、早期腎症の診断指標となるため、外来や健康診断などの領域でも広く有用である。

30

【0003】

シスタチンCの測定方法としては、自動化されたヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法が報告されている(非特許文献1～3、特許文献1)。例えば、非特許文献1記載の方法では、凝集力が強い抗シスタチンCポリクローナル抗体を担体粒子に5%の重量比で結合させて利用しているが、非特許文献4に示されるように、シスタチンCには構造が類似したシスタチンファミリー群が存在し、各種のヒト体液によって局在が異なるため、特異性の低いポリクローナル抗体では、ヒト体液の種類(例えば、唾液や涙液)によっては正確なシスタチンCの測定値が得られない可能性が極めて高い。一方、特許文献1においては、一般的にはポリクローナル抗体を用いた方が免疫凝集体を形成しやすい旨記載されている(20頁21～27行目)。また、特異性が高い抗シスタチンCモノクローナル抗体の利用が示唆されているものの、シスタチンCのような単量体で低分子量の蛋白質を測定対象とする場合は、多くの異なるモノクローナル抗体のカクテルを利用することで良い結果が得られる旨記載されており(21頁5～10行目)、実質的にはポリクローナル抗体が利用されているに等しい。さらに、性能を向上させるためには抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量が5重量%超～35重量%と著しく大量の抗体を結合させる必要があった。

40

【先行技術文献】

50

## 【特許文献】

【0004】

【特許文献1】国際公開第2007/102054号パンフレット

## 【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 40, No. 10, (1994), 1921-1926

【非特許文献2】KIDNEY INTERNATIONAL, Vol. 47, (1995), 312-318

【非特許文献3】CLINICAL CHEMISTRY, Vol. 43, No. 6, (1997), 1016-1022

【非特許文献4】METHODS IN ENZYMOLOGY, Vol. 224, (1994), 685-700

## 【発明の概要】

10

## 【発明が解決しようとする課題】

【0006】

ヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法で汎用されるポリクローナル抗体は、特異性が低く、試料の種類によってシスタチンC特異的な測定ができないという課題が存在していた。その対策としてモノクローナル抗体の利用が考案されたが、凝集力が弱いため、不溶性担体粒子に多種類のモノクローナル抗体からなるカクテルを大量に結合させる必要があり、膨大な手間とコストを要するといった新たな課題が発生していた。それ故、これまでモノクローナル抗体のみからなるヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法は実用化されていなかった。さらに、従来のヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法では、実用的な性能を得るためには抗体感作粒子の総重量に対する結合量が5重量%超～35重量%という大量の抗体が必要であった。

20

従って、本発明は、特異性が高く、低コストで自動化が容易なヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法を提供することを課題とする。

## 【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行った結果、従来、シスタチンCの測定には不向きと考えられていたモノクローナル抗体においても、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、抗体感作粒子の総重量に対して5重量%未満の結合量割合で、それぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を組み合わせれば、シスタチンC特異的な粒子増強免疫測定が可能であることを見出し、本発明を完成した。

30

【0008】

すなわち本発明は、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、認識部位が異なり相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を組合わせた粒子増強免疫測定方法であって、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が5重量%未満であるヒト体液中のシスタチンC測定方法を提供するものである。

また、本発明は、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、認識部位が異なり相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子の組合せであって、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の結合量が5重量%未満である抗体感作粒子を含有する、ヒト体液中のシスタチンC特異的な粒子増強免疫測定試薬を提供するものである。

40

## 【発明の効果】

【0009】

本発明により、従来よりも特異性が高く、低コストで自動分析装置への適応が容易なヒト体液中のシスタチンCの粒子増強免疫測定方法及び試薬を提供することが可能となった。

## 【図面の簡単な説明】

【0010】

50

【図1】抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体 a、b、dをそれぞれ粒子径0.13 μm、0.30 μmのラテックス粒子に結合した抗体感作ラテックス粒子を、a-b、a-d、b-dと同一粒子径同士を組み合わせ、シスタチンCを測定した際の粒子増強免疫凝集に伴う感度を示したシスタチンC濃度-感度曲線である。

【図2】ELISA法で確認した抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体及び、対照とした抗ヒトシスタチンCポリクローナル抗体の特異性を示すグラフである。

【図3】本発明試薬と対照試薬のシスタチンC測定相関図(サンプル数N=50)である。

【図4】本発明試薬と対照試薬の検出限界濃度を示したグラフである。

【発明を実施するための形態】

10

【0011】

本発明で使用する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体は2種以上であり、ヒトシスタチンCと特異的に反応し、高親和性のモノクローナル抗体及び、認識部位が異なり相対的に親和力の弱いモノクローナル抗体、各1種以上を含む。尚、前記抗体には、機能部位を含む抗体断片(すなわち、ヒトシスタチンC認識部位であるFabを含む抗体断片)や、組換え型抗体(すなわち、Fab以外の構造を組換えた抗体)も含む。

前記の高親和性のモノクローナル抗体を獲得する方法は、特に限定されないが、免疫部位や融合細胞の選択、免疫するヒトシスタチンCの増量、免疫期間の延長などが高親和性の抗体を得るのに効果的である。ここでヒトシスタチンCと特異的に反応するとは、ヒトシスタチンCとは抗原抗体反応を起こすが、その他のシスタチンファミリー(例えばヒトシスタチンA、シスタチンB、シスタチンD、シスタチンE/M、シスタチンF、シスタチンS、シスタチンSA、キニノーゲンなど)とは実質的に抗原抗体反応を起こさないことをいう。

20

【0012】

本発明で使用する抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体のうち、高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体は、例えば「商品名:ピアコア(BIACORE(登録商標))GEヘルスケア社製」装置における力価測定による算出で解離定数(kd値)が1nM未満、好ましくは0.5nM以下である。尚、ピアコア装置による解析では、一般的な親和力のモノクローナル抗体の解離定数は1nM以上である。解離定数の確認方法としては、当該分野で公知の通常使用される方法であれば特に限定されないが、測定原理や測定条件によって若干、解離定数が変動する可能性がある。

30

このような高親和性モノクローナル抗体の例としては、後記実施例に示す、ハイブリドーマ75202(FERM BP-11186)が産生するモノクローナル抗体が挙げられる。

【0013】

本発明においては、前記の高親和性モノクローナル抗体を少なくとも1種使用すれば、他の相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体は、一般的な親和力であってもよい。そのような組合せの中でも、高親和性モノクローナル抗体の解離定数で、他の相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の解離定数を除した比が2以上のものが好ましい。このようなモノクローナル抗体は常法に従って製造することができる。なお、親和力(解離定数の対比)に2倍以上の差があれば、解離定数が1nM未満の高親和性モノクローナル抗体同士を組合わせて使用することもできる。

40

【0014】

また、本発明で使用する2種以上のモノクローナル抗体は、それぞれのモノクローナル抗体がヒトシスタチンCの異なる部位を認識するモノクローナル抗体の組合せである。当該認識部位が異なることは、例えばサンドイッチELISA法などによって確認できる。

【0015】

本発明の粒子増強免疫測定方法及び試薬において、不溶性担体粒子として用いられる素材は、検査試薬の成分として利用可能な物質であれば特に制限はないが、具体的にはラテックス、金属コロイド、シリカ、カーボンなどが挙げられる。不溶性担体粒子のサイズは

50

、本発明の粒子増強免疫測定方法及び試薬の検出原理に応じて0.05～0.5 μmまで適宜選択できるが、自動分析装置における光学的測定においては平均粒子径0.1～0.4 μmが汎用されており、好ましくは0.1～0.2 μmである。不溶性担体粒子の平均粒子径は粒度分布計や電子顕微鏡像などで確認することができる。

【0016】

本発明のモノクローナル抗体の組合せにより、それぞれの抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量が5重量%未満であってもヒトシスタチンCの測定が可能であり、抗体量は1重量%以上4重量%未満が好ましい。

【0017】

不溶性担体粒子へのモノクローナル抗体の結合(感作)は、例えば物理吸着法や化学結合法といった常法により行うことができる。

【0018】

本発明の粒子増強免疫測定方法ならびに試薬及びキットにおける測定対象試料は、種々のヒト体液であってヒトシスタチンCを含有する試料であれば特に限定されないが、例えば血清、血漿、滑液、乳、唾液、脳脊髄液、精漿、羊水、尿、涙液などのヒト体液である。

【0019】

本発明の粒子増強免疫測定方法ならびに試薬及びキットは、日立社製を始めとして東芝社製、日本電子社製、オリンパス社製、積水メディカル社製の汎用自動分析装置や近赤外を測定波長とした専用自動分析装置LPIA(登録商標)(三菱化学ヤトロン社製)における濁度法、散乱光強度を測定する装置(DADE BEHRING社製)におけるネフェロメトリー法への適用が可能であるため、自動化が容易である。

【0020】

本発明の粒子増強免疫凝集測定試薬は、主成分の他に、試料のイオン強度や浸透圧などを緩衝する成分として、例えば、酢酸、クエン酸、リン酸、トリス、グリシン、ホウ酸、炭酸、及びグッドの緩衝液や、それらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩などを含んでも良い。また、免疫学的凝集を増強する成分としてポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、リン脂質ポリマーなどの高分子を含んでも良い。また、免疫学的凝集の形成をコントロールする成分として、タンパク質、アミノ酸、糖類、金属塩類、界面活性剤類、還元性物質やカオトロピック物質など粒子増強免疫凝集測定で汎用される成分を1種類、又は複数の成分を組合わせて含んでも良い。さらに、これらの成分を組合わせたキットとしてもよい。

【0021】

本発明のヒトシスタチンCの粒子増強免疫測定方法ならびに粒子増強免疫測定試薬及びキットは、試料中のヒトシスタチンCを高精度かつ特異的に測定するという用途であればいずれにも適用することができる。

【実施例】

【0022】

以下、作製例、評価例ならびに実施例を挙げて本発明の一部を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0023】

〔作製例〕

高親和性抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体の作製

精製ヒトシスタチンC(SCIPAC社)100 μgを1回の免疫に使用した。初回免疫は、ヒトシスタチンCとフロインドの完全アジュバンドを等量混合して調製したエマルジョン200 μLを用い、これをBALB/cマウスの腹腔に注射した。追加免疫にはフロインドの不完全アジュバンドを使用して同様に調製したエマルジョン200 μLを用い、高親和性の抗体を獲得するために2週間間隔で6回の追加免疫を繰り返す長期免疫を行った。マウス眼底静脈より採血した血液中の抗体価をELISA法にて測定し、抗体価の高いマウスを選んで細胞融合に供した。7回目の免疫から2週間後に、ヒトシスタチン

10

20

30

40

50

C 1 0 0  $\mu$  g を生理食塩液 2 0 0  $\mu$  L に溶解したものをマウス腹腔に注射し、3 日後に脾臓を摘出した。脾臓を R P M I 1 6 4 0 培地中でほぐした後、1 5 0 0 r p m で遠心分離して脾細胞を回収した。これを牛胎児血清フリーの R P M I 1 6 4 0 培地で 3 回以上洗浄後、1 5 % 牛胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地 2 m L を加えて懸濁し、脾細胞懸濁液とした。脾細胞とミエローマ細胞 S P 2 / 0 - A G 1 4 を 6 対 1 の割合で混合した後、5 0 % ポリエチレングリコール存在下で細胞融合させ、ハイブリドーマ（融合細胞）を得た。1 5 0 0 r p m の遠心分離で沈殿部を集め、G K N 液（グルコース 2 g、塩化カリウム 0 . 4 g、塩化ナトリウム 8 g、リン酸水素二ナトリウム 1 . 4 1 g 及びリン酸二水素ナトリウム二水和物 0 . 7 8 g を精製水に溶かして 1 リットルとしたもの）に懸濁、遠心分離により洗浄後、沈殿部を回収した。これを 1 5 % 牛胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地 3 0 m L に懸濁したものを 1 ウェルあたり 1 0 0  $\mu$  L、及びフィーダー細胞として B A L B / c マウスの胸腺細胞を  $2 . 5 \times 1 0^6$  個 / m L 含む H A T 培地を 1 ウェルあたり 2 0 0  $\mu$  L ずつ 9 6 穴マイクロプレート 3 枚にそれぞれ分注し、3 7 °C にて 5 % 炭酸ガス培養器中でハイブリドーマを培養した。

10

## 【 0 0 2 4 】

培養上清中の抗ヒトシスタチン C 抗体の存在を、ヒトシスタチン C を固相化した E L I S A 法で確認し、1 0 日後に全てのウェルでハイブリドーマの増殖を確認した。詳細には、1 0  $\mu$  g / m L のヒトシスタチン C 及び 1 5 0 m M 塩化ナトリウムを含む 1 0 m M リン酸緩衝液（p H 7 . 2 ; 以下、P B S と略す）1 0 0  $\mu$  L を前記ハイブリドーマの増殖が確認された 9 6 穴マイクロプレートに分注し、4 °C で一晩放置した。次に、この 9 6 穴マイクロプレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 及び 1 % 牛血清アルブミン（以下 B S A ）を含む P B S 3 0 0  $\mu$  L で 3 回洗浄した後、各ウェルの培養上清を 5 0  $\mu$  L / ウェル加え、室温で 1 時間放置した。その後、当該プレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S で 3 回洗浄の後、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体（積水メディカル株式会社製）を 5 0  $\mu$  L / ウェル加え、室温で 1 時間放置した。その後、当該プレートを 0 . 0 5 % T w e e n 2 0 を含む P B S で 3 回洗浄後、0 . 2 % オルトフェニレンジアミン及び 0 . 0 2 % 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液（p H 5 ）5 0  $\mu$  L / ウェルを加え、室温で 1 5 分間放置後、4 . 5 N 硫酸 5 0  $\mu$  L / ウェルを加えて反応を停止させ、各ウェルの波長 4 9 2 n m における吸光度を測定し、吸光度の高いウェルを陽性ウェルとして選択した。

20

## 【 0 0 2 5 】

単クローン化は限界希釈法で行った。すなわちフィーダー細胞として B A L B / c マウスの胸腺細胞を 1 ウェルあたり  $1 0^6$  個ずつ分注した 9 6 穴マイクロプレートに、前記陽性ウェル中のハイブリドーマを 1 0 個 / m L となるように希釈したものを 0 . 1 m L ずつ分注した。培地は、初回は H T 培地を、2 回目以降は 1 5 % 牛胎児血清を含む R P M I 1 6 4 0 培地を用い、3 7 °C にて 5 % 炭酸ガス培養器中で 1 0 日間培養した。E L I S A 法による陽性ウェルの選択及び限界希釈法による単クローン化操作を各 3 回繰り返して、反応性の高い抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを得た。各ハイブリドーマの約  $1 0^5$  個をプリスタン前処理したマウス腹腔に投与し、生成した腹水をそれぞれ採取した。採取した各腹水から遠心分離により不溶物を除去し、等量の飽和硫安液を加え、攪拌しながら一晩放置後、遠心分離で沈殿を回収した。回収した沈殿を 2 0 m M トリス緩衝液（p H 8 ）に溶解し、同緩衝液で透析した。透析内容物それぞれを同緩衝液で平衡化した D E A E - セファロースカラムに別個に吸着させた後、それぞれ同緩衝液中の塩化ナトリウム 0 ~ 3 0 0 m M の濃度勾配で溶出させ、各種精製抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体を得た。

30

40

## 【 0 0 2 6 】

## 〔 評価例 1 〕

認識部位が異なる抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体の選択

サンドイッチ E L I S A 法における反応性を指標として、作製した抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体間で認識部位が異なる組合せの探索をおこなった。具体的には、各抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体を各 1  $\mu$  g / m L を含む P B S 5 0  $\mu$  L / ウェル加

50

え、室温2時間静置してプレートに固相化した後、0.05% Tween 20を含むPBS 300  $\mu$ Lで3回洗浄し、0.05% Tween 20及び1% BSAを含むPBS 300  $\mu$ L/ウェル加え、室温1時間静置した。その後、0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄の後、10 ng/mL ヒトシスタチンCを含むPBS 50  $\mu$ L/ウェル加え、室温1時間静置して反応させ、0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄の後、検出用にビオチン化した各抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体1  $\mu$ g/mLを含むPBS 50  $\mu$ L/ウェル加え、室温1時間静置した。0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄の後、5000倍に希釈したペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン(ZYME社)を50  $\mu$ L/ウェル加えて室温で1時間静置し、当該プレートを0.05% Tween 20を含むPBSで3回洗浄後、0.2% オルトフェニレンジアミン及び0.02% 過酸化水素を含むクエン酸緩衝液(pH 5) 50  $\mu$ L/ウェルを加え、室温で15分間反応後、4.5 N 硫酸50  $\mu$ L/ウェルを加えて反応を停止させ、各ウェルの波長492 nmにおける吸光度を測定し、反応性が認められた組合せを認識部位が異なるモノクローナル抗体とした。その結果、4種類の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a~dにおいて表1に示したような組合せが可能であることを確認した。

【0027】

【表1】

		固相化抗体			
		a	b	c	d
ビオチン化抗体	a	—	++	—	+
	b	++	—	—	++
	c	+	—	—	+
	d	++	++	—	—

++:強い反応性あり +:反応性あり -:反応性なし

【0028】

抗体aに関してはb~dいずれの抗体とも組合せが可能であることを確認した。また抗体cに関しては、固相化した状態では、組合わせる抗体に関わらず反応性を示さなくなることから、不溶性担体への結合、すなわち固相化が必要な粒子増強免疫測定方法での利用は不可能と考えられた。

【0029】

〔評価例2〕

認識部位が異なる抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体組合せにおける粒子増強免疫凝集の確認

抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a、b、dをそれぞれ独立して少量結合させた抗体感作ラテックス粒子を調製し、認識部位が異なる組合せでヒトシスタチンC濃度依存的な粒子増強免疫凝集の形成を確認した。

【0030】

(抗体感作ラテックス粒子の調製)

平均粒径0.13  $\mu$ m又は0.3  $\mu$ m(積水メディカル社製)の0.5%ラテックス溶液(30 mM Tris-HCl pH 8.5~9.0)に、0.2 mg/mLの各シスタチンCモノクローナル抗体溶液(30 mM Tris-HCl pH 8.5~9.0)を等量添加して4 1時間攪拌後、等量の1% BSA溶液(30 mM Tris-HCl pH 8.5~9.0)を添加して4 30分間攪拌し、遠心して上清を除去後、沈殿を精製水で再懸濁し抗体感作ラテックス粒子溶液とした。このとき、抗体感作粒子の総重量

に対する抗体の結合量は約 3.8 重量%となる。

【0031】

(第一試薬の調製)

750 mM の塩化カリウム、1% BSA を含む 30 mM CHES 緩衝液 (pH 8.75) を調製し第一試薬とした。

【0032】

(第二試薬の調製)

2 種類の抗体感作ラテックス粒子溶液を等量混合し、5 mM MOPS 緩衝液 (pH 7.0) で最終吸光度 2.0 OD となるように希釈して第二試薬とした。試薬は評価例 1 の結果で強い反応性が認められた a - b、a - d、b - d の各抗体感作ラテックス粒子を、同一の粒子径同士で組合わせて調製した。

10

【0033】

(測定方法)

第一試薬と第二試薬を組合わせ、日立 7170 形自動分析装置を用いてヒトシスタチン C 濃度依存的な粒子増強免疫凝集の形成を確認した。具体的には、濃度 0、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0 mg/L のヒトシスタチン C 溶液 2.5  $\mu$ L に第一試薬 100  $\mu$ L を加えて 37 °C で 5 分間加温後、第二試薬 100  $\mu$ L を加えて攪拌した。その後 5 分間の凝集形成に伴う吸光度変化を、主波長 570 nm、副波長 800 nm における感度として測定した。

【0034】

20

(結果)

抗体 a 感作ラテックス粒子と抗体 b 感作ラテックス粒子を組合わせた試薬で各濃度のシスタチン C 溶液を測定したところ、図 1 記載のシスタチン C 濃度 - 感度曲線に示したように、いずれの粒子でもシスタチン C 濃度依存的に感度が上昇し測定が可能であることが確認された。0.13  $\mu$ m 粒子 (黒四角) では低濃度域の感度がやや低いものの高濃度域の感度伸長が良好で、0.3  $\mu$ m 粒子 (白四角) では低濃度域は高感度であるが、高濃度域の感度伸長が不良であった。また、抗体 a 感作ラテックス粒子と抗体 d 感作ラテックス粒子を組合わせた試薬では、0.13  $\mu$ m 粒子 (黒丸) と 0.3  $\mu$ m 粒子 (白丸) における低濃度域の感度が同等で、0.13  $\mu$ m 粒子では高濃度域まで感度が上昇するのに対し、0.3  $\mu$ m 粒子ではほとんど感度伸長が認められなかった。したがって、組合せによっては利用できない粒子があるものの、両組合せとも免疫凝集測定方法への適用が可能と考えられた。一方、破線で示した抗体 b 感作ラテックス粒子と抗体 d 感作ラテックス粒子を組合わせた試薬では、0.13  $\mu$ m 粒子 (黒三角)、0.3  $\mu$ m 粒子 (白三角) いずれにおいても、シスタチン C 濃度依存的な感度上昇はほとんど認められず、粒子増強免疫測定方法での利用は困難と考えられた。

30

【0035】

(評価例 3)

ピアコアによる抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体の解離定数確認

ピアコア装置 (GEヘルスケア社) を利用し、常法に則り精製抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体 a、b、および d の解離定数を算出した。具体的には、Mouse Antibody Capture Kit (GEヘルスケア社) を用いて、センサーチップにそれぞれ抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体を固定化し、濃度 0  $\mu$ g/mL 及び 0.0625、0.125、0.25、0.5、1.0  $\mu$ g/mL までのヒトシスタチン C (R&D Systems 社) との反応性から解離定数を算出した (表 2)。評価例 2 で粒子増強免疫測定への適用が可能と考えられた組合せ a - b、a - d は、高親和性の抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体 a (解離定数: 0.29 nM) と、通常の親和力の抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体 b (解離定数: 1.32 nM) もしくは d (解離定数: 2.30 nM) の組合せとなっており、解離定数の比はそれぞれ、b/a (1.32/0.29) が約 4.6、d/a (2.30/0.29) が約 7.9 と、組合わせた抗体間で明確な親和性の差が認められた。その一方で、粒子増強免疫凝集への適用が不可能と

40

50

考えられた b - d は、一般的な親和力の抗体同士の組合せであり、また解離定数の比  $d / b$  ( $2.30 / 1.32$ ) は約 1.7 と明確な親和力の差が認められなかった。このうち高親和性が最も汎用性が高いと考えられるモノクローナル抗体 a を産生するハイブリドーマ 75202 を選択した。このハイブリドーマは、独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター (〒305 - 8566 日本国茨城県つくば市東 1 - 1 - 1 中央第 6) に 2008 年 11 月 20 日に受領番号 (FERM BP - 11186) として寄託した。

【0036】

【表 2】

抗体	解離定数 KD値(nM)
a	0.29
b	1.32
d	2.30

10

【0037】

〔評価例 4〕

E L I S A 法による抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体特異性の確認

E L I S A 法にて、今回作製した抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体 a、b、d の特異性評価を行った。詳細には  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  のヒトシスタチン C 及びシスタチンファミリーに属するヒトシスタチン A、シスタチン B、シスタチン D、シスタチン E / M、シスタチン F、シスタチン S、シスタチン SA、キニノーゲン (いずれも R & D System s 社) を含む P B S  $50 \mu\text{L}$  を 96 穴マイクロプレートに分注し、4 時間で一晚静置してプレートに固相化した。次にこの 96 穴マイクロプレートを、 $0.05\%$  Tween 20 を含む P B S  $300 \mu\text{L}$  で 3 回洗浄した後、 $0.05\%$  Tween 20 及び  $1\%$  B S A を含む P B S  $300 \mu\text{L}$  / ウェル加え、室温 1 時間静置した。その後、作製した各抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体  $1 \mu\text{g} / \text{mL}$  を含む P B S  $50 \mu\text{L}$  / ウェル加え室温 1 時間静置し、 $0.05\%$  Tween 20 を含む P B S で 3 回洗浄の後、P B S で 5000 倍に希釈したペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体 (B i o s o u r c e 社) を  $50 \mu\text{L}$  / ウェル加え、室温で 1 時間静置した。その後、当該プレートを  $0.05\%$  Tween 20 を含む P B S で 3 回洗浄し、 $0.2\%$  オルトフェニレンジアミン及び  $0.02\%$  過酸化水素を含むクエン酸緩衝液 (p H 5)  $50 \mu\text{L}$  / ウェルを加え、室温で 15 分間反応後、 $4.5\text{N}$  硫酸  $50 \mu\text{L}$  / ウェルを加えて反応を停止させ、各ウェルの波長  $492 \text{nm}$  における吸光度を測定した。

20

30

対照として、抗ヒトシスタチン C モノクローナル抗体の代わりに抗ヒトシスタチン C ウサギポリクローナル抗体 (B i o V e n d o r 社)、ペルオキシダーゼ標識抗マウス抗体の代わりにペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体 (C A P P E L 社) を使用し特異性を比較した。

40

【0038】

図 2 に示したように、モノクローナル抗体 a、b、d いずれのモノクローナル抗体もヒトシスタチン C のみと特異的に反応することが確認されたことから、これらの抗体を利用することによって、ヒト体液中のシスタチン C を特異的に測定できると考えられる。一方、対照としたポリクローナル抗体は、シスタチン C に加えてシスタチン B、シスタチン D、シスタチン E / M、シスタチン S、シスタチン SA、シスタチン SN に対して同程度の強い反応性を、またシスタチン A、シスタチン F、キニノーゲンに対しても弱い反応性を示すことから、抗シスタチン C ポリクローナル抗体を利用した測定においては、これらシ

50

スタチンファミリー分子が共存する試料ではシスタチンCの正確な測定は不可能であるものと予想された。

【0039】

評価例1-4を繰り返した結果、さらに粒子増強免疫測定への適用が可能と考えられる抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体e、f、gを用いた組合せ1、および2を見出した。いずれも解離定数1nM未満の高親和性抗体を少なくとも1種類含む組合せで、組合せ1は高親和性抗体同士の組合せで、解離定数の比は約2.1、組合せ2は高親和性抗体と一般的な親和力の抗体の組合せで、解離定数の比は約15.4であった(表3)。

【0040】

【表3】

組合せ	抗体	解離定数	
		KD値(nM)	比
1	a	0.29	2.07 (a/e)
	e	0.14	
2	f	0.54	15.37 (g/f)
	g	8.30	

10

20

【0041】

〔実施例〕

抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a及びbを使用し、ラテックス粒子径及び、その他諸条件を日立7170形自動分析装置の測定に最適化した本発明のシスタチンC測定試薬を調製し、抗シスタチンCポリクローナル抗体を使用している既存のシスタチンC測定試薬(DADE BEHRING社 N-ラテックス シスタチンCキット)と性能比較を実施した。なお抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を使用した汎用自動分析装置用の測定試薬は、入手することができなかった。

30

【0042】

(抗体感作ラテックス粒子の調製)

平均粒径0.15µmの0.5%ラテックス溶液(30mM Tris-HCl pH 8.5)に、等量の0.15mg/mL抗体a又はb溶液(30mM Tris-HCl pH 8.5)を添加して4時間攪拌後、等量の1%BSA溶液(30mM Tris-HCl pH 8.5)を添加して430分間攪拌し、遠心して上清を除去後、沈殿を精製水で再懸濁し抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体a及びb感作ラテックス粒子溶液とした。このとき、抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量は約2.9重量%となる。

【0043】

(第一試薬の調製)

750mMの塩化カリウム、1%BSAを含むpH8.0の30mM Tris-HClを調製し第一試薬とした。

【0044】

(第二試薬の調製)

抗体a感作ラテックス粒子溶液と抗体b感作ラテックス粒子溶液を等量混合し、5mM MOPS緩衝液(pH7.0)で最終吸光度1.5ODとなるように希釈して第二試薬とした。

【0045】

(測定試料)

40

50

ヒト血清検体

【0046】

(測定条件)

日立7170形自動分析装置：パラメータ条件

- ・検体 - 第一試薬 - 第二試薬；2.4  $\mu$ L - 120  $\mu$ L - 120  $\mu$ L
- ・分析法；2ポイントエンド法（測定ポイント18 - 34）
- ・測定波長；主波長570 nm / 副波長800 nm
- ・キャリブレーション；スプライン

【0047】

(測定方法)

濃度0、0.5、1.0、2.0、4.0、10.0 mg / LのヒトシスタチンC溶液の測定感度から検量線を作成し、その検量線をもとに各試料中のシスタチンC濃度を測定し、対照試薬と相関性（サンプル数N = 50）、同時再現性（連続測定回数n = 10）、検出限界濃度（シスタチンC濃度ゼロ試料の測定平均感度 + 2SDと、シスタチンC濃度既知試料の測定平均感度 - 2SDのエラーバーが重ならない濃度を検出限界濃度とする）を比較した。

【0048】

(対照試薬及び分析装置)

対照試薬：N - ラテックス シスタチンCキット

分析装置：BN Prospe c

以上 D A D E B E H R I N G社製

【0049】

(結果)

本発明の試薬と対照試薬の検体測定値の相関性は良好であった（図3）。また再現性に関しては、本発明の試薬の変動係数は既存試薬の1 / 5以下と小さく再現性に優れていた（表4）。さらに検出限界濃度に関しても、対照試薬がシスタチンC濃度0.2 mg / Lであるのに対し、本発明の試薬は0.05 mg / Lと1 / 4以下の低濃度まで検出可能であることを確認した（図4）。

高親和性の抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体と、それとは認識部位が異なり、相対的に親和力の弱い抗ヒトシスタチンCモノクローナル抗体を、不溶性担体粒子にそれぞれ独立して結合させた抗体感作粒子を利用した本発明の粒子増強免疫測定方法により、抗体感作粒子の総重量に対する抗体の結合量が、従来試薬において利用されてきた5重量%超～35重量%よりも少量で、低コストであるのみならず、高性能かつ特異性の高いヒト体液中のシスタチンCの測定方法が達成された。

【0050】

10

20

30

【表 4】

		本発明試薬		対照試薬	
		試料1	試料2	試料1	試料2
		0.49	1.99	0.379	1.64
		0.49	2.00	0.397	1.69
		0.49	2.01	0.401	1.66
		0.49	2.01	0.406	1.64
		0.48	2.01	0.424	1.75
		0.48	2.01	0.408	1.71
		0.49	2.01	0.379	1.75
		0.48	2.01	0.447	1.75
		0.49	2.01	0.428	1.71
		0.50	1.99	0.383	1.72
平均値 (mg/L)		0.49	2.01	0.41	1.70
標準偏差		0.006	0.008	0.023	0.043
変動係数 (%)		1.30	0.42	5.57	2.55

10

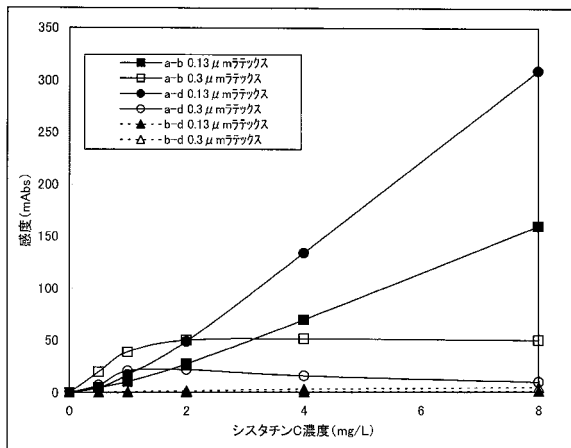
【産業上の利用可能性】

20

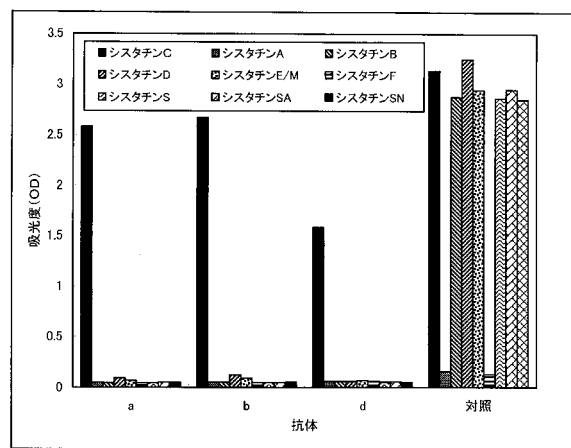
【0051】

本発明の粒子増強免疫測定方法ならびに試薬及びキットにより、高性能、安価かつ簡便なヒト体液中のヒトシスタチンCの検出・測定方法を提供する。

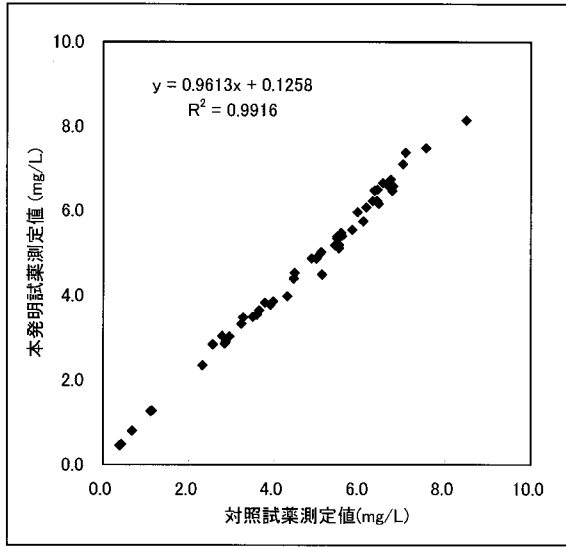
【図 1】



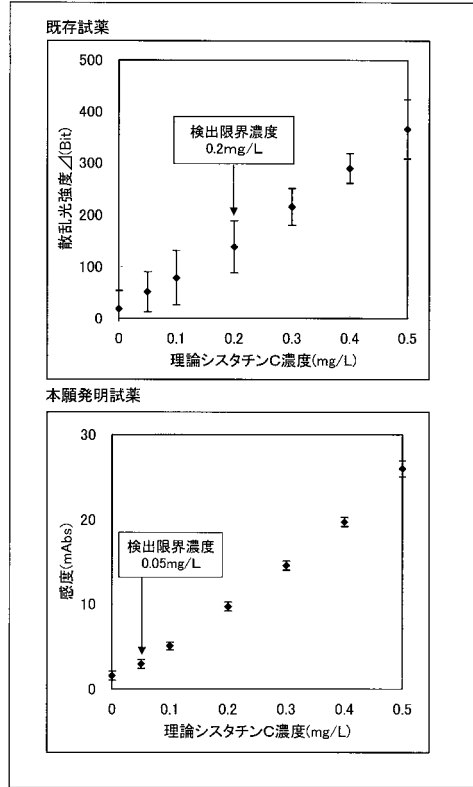
【図 2】



【 図 3 】



【 図 4 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 中山 真也  
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 高橋 弘至  
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 中村 靖  
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内
- (72)発明者 清水 知  
茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番地1 積水メディカル株式会社つくば研究所内

審査官 吉田 将志

- (56)参考文献 特開平11-108929(JP,A)  
特開2006-266970(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98  
CA/MEDLINE/BIOSIS(STN)  
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamIII)

专利名称(译)	测量人体体液中胱抑素C的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5554247B2</a>	公开(公告)日	2014-07-23
申请号	JP2010541240	申请日	2009-12-03
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	中山真也 高橋弘至 中村靖 清水知		
发明人	中山 真也 高橋 弘至 中村 靖 清水 知		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N2333/8139 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/53.D G01N33/577.B G01N33/543.581.D		
代理人(译)	村田正树		
审查员(译)	吉田正志		
优先权	2008309369 2008-12-04 JP		
其他公开文献	JPWO2010064435A1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

与使用大量低特异性多克隆抗体和高特异性但弱聚集的单克隆抗体的常规测量方法相反，它是高度特异性且廉价且易于在人体体液中自动化的。提供了一种用于胱抑素C的颗粒增强免疫测定方法。将具有不同识别位点和相对弱亲和力的高亲和力抗人胱抑素C单克隆抗体和抗人半胱氨酸蛋白酶抑制剂C单克隆抗体分别独立地结合到不溶性载体颗粒上的抗体致敏颗粒进行组合。一种颗粒增强免疫测定方法，其中与每种抗体致敏颗粒的重量结合的抗人胱抑素C单克隆的量小于5%重量。

		固相化抗体			
		a	b	c	d
ビオチン化抗体	a		++	-	+
	b	++		-	++
	c	+	-		+
	d	++	++	-	

++:強い反応性あり +:反応性あり -:反応性なし